Таблица 2

Содержание пероксидазы в эпителиальных клетках влагалищных мазков овцематок при нормальных родах и не раскрытии шейки матки

№ о/м	Среднее количество гранул пероксидазы в эпителиальных клетках влагалищного мазка	
	при нормальных родах	при патологических родах
1	14,90±1,8	1,3±0,33
2	13,35±1,3	1,05±0,2
3	13,15±0,76	0,75±0,26
4	12,90±0,77	0,8±0,28
5	15,3±0,9	0,65±0,23
6	14,5±1,02	0,55±0,1
7	14,35±0,7	0,65±0,2
8	18,25±1,4	0,85±0,2
9	15,6±1,7	1,00±0,26
10	17,85±1,25	0,9±0,26
11	15,5±0,94	0,8±0,2
12	13,8±0,98	0,15±0,25
13	16,85±1,02	0,6±0,21
14	15,1±0,85	0,7±0,23
15	14,65±0,79	0,65±0,24
16	16,0*0,8	0,8±0,15
17	15,4±1,4	0,7±0,1
18	13,8±0,8	1,0±0,3
19	17,2±1,2	0,9±1,4
20	18,6±0,4	0,7±0,1
M±m	15,35±0,4	0,7±0,51

НЖК, мы, изучая их метаболизм, косвенным путем судили о простагландиновой недостаточности организма животного.

Динамику активности пероксидазы мы определяли посредством подсчета количества пероксисом, которые выявлялись в виде четких коричнево-черных гранул в цитоплазме эпителиальных клеток влагалищных мазков овцематок с патологией родового акта и нормальными родами.

В результате исследования влагалищных мазков здоровых и больных овец было установлено среднее содержание гранул пероксидазы в цитоплазме клеток: 15,07±0,41 (при нормальных родах) и 0,8±0,51 (при патологии). Наименьшее количество пероксисом эпителиальных клеток у здоровых овцематок – 12,9±0,77; наибольшее – 18,25±1,45; при нераскрытии шейки матки, соответственно, 1,3±0,33 и 0,65±0,2 (табл. 2).

У овцематок с нормальной родовой деятельностью гранулы пероксидазы были четко окрашены, округлой формы, распределялись по всей цитоплазме эпителиальных клеток влагалищных мазков. У животных с нераскрытием шейки матки локализация пероксисом в цитоплазме была крайне неравномерна, общее количество гранул фермента сильно снижено по сравнению с нормой, в некоторых клетках они не были обнаружены совсем. Окраска внутриклеточных включений у больных животных была слабее по сравнению с нормой. Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено снижение активности фермента пероксидазы в эпителиальных клетках влагалищных мазков овцематок с не раскрытием шейки матки по сравнению с нормально протекающим родовым актом. Исходя из того, что уровень активности пероксидазы в эпителии влагалища зависит от уровня концентрации эстрадиола в организме животного, можно сделать вывод о его слабой эстрогенной насыщенности, что свидетельствует о существенных гормональных нарушениях, происходящих в результате воздействия возбудителей инфекции.

Д.В. Колбасов, В.А. Цыбанова, Т.Е. Фирсова
(ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, г.Покров)

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ ЛИСТЕРИЙ В РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ

Введение

Широкий спектр восприимчивых животных и людей, способность длительное время сохраняться во внешней среде и продуктах питания определяет необходимость дальнейшего изучения природы возбудителя с целью разработки новых, более чувствительных и специфичных средств и методов идентификации патогенных листерий [1].

В настоящее время для обнаружения патогенных листерий широко применяют методы анализа генома, которые на основании сравнения генотипов позволяют их дифференцировать. Поэтому для идентификации патогенных штаммов листерий основное внимание уделяется поиску генетических маркеров (гены hly, iap, prfA, plcB, lmaA, inlA), локализованных на хромосомной ДНК, которые ответственны за проявление вирулентных свойств [5].

Листерии широко распространены во внешней среде и сравнительно устойчивы к воздействию физических и химических факторов.

Установлена высокая их устойчивость к охлаждению, замораживанию, воздействию факторов посола (различных концентраций поваренной соли, применяемых ингредиентов), а также к воздействию основных дезинфицирующих средств [2].

Поваренная соль в концентрациях более 2,5–14% способствует снижению содержания листерий, однако не отмечено полной потери жизнеспособности возбудителя. При этом их число уменьшается в зависимости от повышения концентрации NaCl и удлинения сроков действия до 5 суток [3].

С целью улучшения и ускорения бактериологических исследований созданы различные селективные среды для выделения и обогащения листерии. Поэтому для выделения листерий из пищевых продуктов часто приходится проводить высев на жидкие среды обогащения перед посевом на плотные питательные среды. Рекомендуется при этом производить посев одного и того же образца одновременно на разные среды обогащения [4].

В настоящее время доказано, что не только молочные, мясные и рыбные продукты могут быть источником распространения патогенных листерий. Поэтому, в последние годы листерии считают одним из важнейших критериев безопасности молочных, мясных и рыбных продуктов. В странах ЕС и США введено обязательное исследовании мясных и других пищевых продуктов на наличие патогенных листерий. Это связано с довольно частым обнаружением этого возбудителя в продуктах питания [1].

Целью данной работы явилось выявление ДНК патогенных листерий в образцах рыбной продукции методом ПЦР.

Материалы и методы

В работе использованы различные референс-штаммы листерий: L. monocytogenes (766, 9127); L. murray; L. welshimeri; L. seeligery; L. innocua; L. ivanovii; L. grayi, полученные из музея штаммов ГНУ ВНИИВВиМ.

Изучение культурально-морфологических свойств, подвижности и патогенности исследуемых культур микроорганизмов проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по лабораторной диагностике листериоза животных и людей», утвержденных МСХ и Министерства здравоохранения РФ.

Для выделения хромосомной ДНК из листерий использовали фенольно-детергентный метод, после предварительной обработки клеток протеиназой К.

Амплификацию фрагментов ДНК проводили в 20-50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-HCl (pH 8,9), 3 мМ $MgCl$, 40 мМ KCl, 0,2 мМ смеси dNTP, 1 мкМ каждого праймера, 1-5 нг ДНК, 1-2 ед. акт. Taq-полимеразы. Амплификацию осуществляли 30-кратным повторением последовательности следующих стадий: денатурации (94° С, 1-3 мин), отжига (47-65° С, 1–3 мин) и полимеризации (70-72° С, 1–5 мин) на термоциклере «Touch Down» Hybaid (Англия) с использованием Taq-полимеразы, (Сибэнзим, Россия). Учет результатов ПЦР проводили визуально после электрофореза продуктов ПЦР в 1,5-2,0% агарозном геле и окрашивания геля бромистым этидием.

Результаты исследований

Для обнаружения ДНК патогенных штаммов возбудителя листериоза были синтезированы две пары праймеров, комплементарные последовательностям гена листериолизина, фланкирующие последо-

вательности размерами 700 и 308 п.о.

При отработке оптимального режима амплификации с использованием ДНК L.monocytogenes (шт. 766, 9127) было установлено, что размеры полученных ПЦР продуктов соответствовали расчетным и равнялись 700 и 308 п.о.

Анализ ДНК L.monocytogenes, а также L. murray, L. welshimeri, L. seeligery, L. innocua, L. ivanovii, L. grayi с использованием данных праймеров показал, что при температуре отжига 50-55° С указанные праймеры взаимодействовали только с ДНК L. monocytogenes (шт. 766, 9127). При исследовании ДНК, выделенных от других видов листерий, бактерий E.coli, S. aureus и Bac. cereus, специфических продуктов ПЦР не было выявлено.

Для определения порога чувствительности метода ПЦР для обнаружения ДНК листерий были исследованы 10-кратные разведения штамма L. monocytogenes 766. Параллельный контроль количества листерий проводили высевом на твердые питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Результаты экспериментов показали, что с помощью ПЦР удается обнаруживать ДНК L. monocytogenes в концентрациях 10-100 $КОЕ_{50/мл}$.

Целью следующего этапа работы явилось обнаружение ДНК патогенных листерий в пробах байкальского омуля с помощью ПЦР. Из образцов байкальского омуля для исследования были взяты наиболее широко потребляемые виды рыбных продуктов: свежевыловленная, слабосоленая и копченая рыбы.

Всего было исследовано 450 проб рыбных продуктов, отобранных в различных районах Бурятии, а также с рынков г.Улан-Удэ и поселков, расположенных на Байкале и вблизи больших рек.

В связи с тем, что рыбные продукты, подвергались воздействию различных физико-химических факторов, перед постановкой ПЦР листерии подращивали на бактериологических питательных средах. Было отмечено что листерии с пониженной жизнеспособностью не проявляли четких идентификационных признаков и поэтому их сложно было дифференцировать.

Нами была использована следующая схема для исследования рыбных продуктов. Навеску (25 г), жабры и мышцы рыб с кожей гомогенизировали в стерильной питательной среде МПБ и инкубировали в селективной питательной среде в течение 48 часов при 30° С. Далее отобранные аликвоты высевали на селективную твердую питательную среду для роста листерий и культивировали в течение 48 часов при 30° С и для анализа отбирали не менее 10 колоний листерий.

Каждую колонию отбирали стерильной петлей и суспендировали в 30 мкл буфера. ДНК листерий выделяли фенольно-детергентным методом или методом кипячения в течение 10 мин. Полученный материал исследовали в ПЦР. Исследование свежевыловленного омуля на наличие листерий показало, что их содержание в рыбе составляет менее 0,1%. Концентрация листерий в омуле значительно зависела от того места, где рыба была выловлена. Больше всего листерий содержит рыба, выловленная в реках вблизи крупных поселков и животноводческих ферм, в которые спускают сточные воды. Процент контаминации листериями слабосоленого и мороженого омуля составил 1-2%. Уровень зараженности листериями копченого омуля составлял 3-4%. Полученные данные свидетельствуют о том, что свежий, охлажденный или мороженый байкальский омуль неопасен для потребления в пищу и практически не содержит патогенных листерий.

В период с 2004 по 2005 гг. во ВНИИВВиМ было исследовано 67 образцов рыбы и рыбной продукции. Образцами служили следующие материалы: сырая потрошеная рыба, рыбное филе, соленое филе, филе холодного копчения, сырая мороженая рыба, пресервы, соленая икра, рыбные котлеты. Кроме того были исследованы пробы воды из садков осетров и рыбный корм.

В результате проведенных исследований из 53 проб рыбной продукции, воды и рыбного корма было выделено 22 культуры листерий: из них L. monocytogenes – 8; L. innocua – 12; L. welshimeri – 1; L. seeligeri – 1.

Идентификация листерий была проведена по следующим признакам: морфология микроба; культуральные и биохимические свойства; патогенность для лабораторных животных и чувствительность культур к листериозным бактериофагам.

При определении серогрупповой принадлежности 8-ми изолятов L. monocytogenes, 7 изолятов были отнесены к 1-ой серогруппе, 1 изолят ко 2-ой серогруппе.

Кроме того, выделенные изоляты исследовали методом ПЦР. С этой целью было использовано 2 праймера, комплементарных нуклеотидным последовательностям гена листериолизина, позволяющих дифференцировать патогенные листерии от других видов листерий.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР показал, что специфические праймеры амплифицировали фрагменты ДНК в 8-ми пробах L. monocytogenes и не гибридизовались с хромосомной ДНК других видов листерий. Полученные фрагменты имели размеры, соответствующие расчетному значению.

В результате проведенных исследований установлено, что патогенные листерии в основном выделены из образцов пресервов, рыбных котлет, икры и рыбы холодного копчения, то есть продукции, которая проходит технологическую обработку.

В пробах сырой потрошеной и мороженой рыбы, соленого филе, икре, а также в пробах воды из садков осетров и рыбного корма патогенных листерии не выявлено.

Заключение

Нами установлено, что метод ПЦР с использованием праймеров, комплементарных гену hly, пригоден для обнаружения листерий в пробах байкальского омуля. По мнению специалистов иаиболее распространенными местами обнаружения листерий на пищевых и мясоперерабатывающих предприятиях – это технологическое оборудование, водостоки, полы и холодильные камеры. Поэтому производственные помещения, технологическое оборудования, инвентарь, особенно холодильники должны подвергаться ежедневной мойке, санитарной обработке и должен поддерживаться высокий уровень санитарии производства. Сточные воды от животноводческих помещений, пищевых предприятий, прилегаемой к ним территории, перед выпуском в наружную канализационную сеть должны дезинфицироваться. Таким образом проведенные исследования показали, что контаминация рыбной продукции листериями в основном может происходить процессе производства и хранения.

РЕЗЮМЕ

В представленной работе установлено, что с использованием праймеров, комплементарных последовательностям гена листериолизина возбудителя листериоза, можно обнаруживать ДНК возбудителя листериоза в клинических образцах и продуктах питания при проведении лабораторных исследований.

Литература

1. Бакулов И.А., Васильев Д.А. Пищевой листериоз – новое проявление известной болезни. (Обзор иностранной литературы за 1984-1994 годы)// Вестник РАСХН. 1995. N2. С. 69-72
2. Костенко Ю.Г., Шагова Т.С., Янковский К.С. Листерии – критерий безопасности мясных продуктов // Мясная Индустрия. 1997. № 3. С. 23-24.
3. Костенко Ю.Г., Шагова Т.С., Янковский К.С. Жизнеспособность лйстерий при воздействии технологических факторов производства мясных продуктов // Joum. Tehnologija mesa. Jugoslavia. 1997. №4. С. 163-165.
4. Костенко Ю.Г., Шагова Т.С., Янковский КС. Пищевой листериоз – проблема мясной промышленности // Сборник научных трудов\ ВНИИМП. М. 1997., С. 168–172.
5. Rasmussen,O.F., Skouboe,P., Dons,L., Rossen,L. and Olsen,J.E. Listeria monocytogenes exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes.// J. Microbiology, 1995, 141, 2053-2061

УДК: 619: 616.98: 579.869.2: 619: 619 – 085.371: 619: 616 – 087: 636.4

С.П. Скляров, В.И. Дорофеев, М.Н. Веревкина, Е.В. Светлакова

(ФГОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет)

НАПРЯЖЕННОСТЬ ГУМОРАЛЬНОГО ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У СВИНЕЙ, ПРИВИТЫХ ПРОТИВ РОЖИ ВАКЦИНОЙ ИЗ ШТАММА ВР-2, НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФРАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННОЙ ВОДЫ

В последние годы во многих регионах России наметился значительный подъем уровня заболеваемости и гибели сельскохозяйственных животных от различных инфекционных, инвазионных и незаразных болезней, что значительно тормозит развитие животноводства в нашей стране (И.И. Гурский, В.Н. Костев, В.С. Ивашина, 1997; Г.Э. Дремач, В.Э. Дремач, 2000; Р.В. Душук, Л.В. Тихонов, Л.В. Семенов, 2001).